

メンブレン・ストレスバイオテクノロジーとしての 細胞膜損傷の誘発による殺菌とモニタリング

土戸 哲明*・坂元 仁

生物を対象としてストレスをバイオテクノロジーに利用する立場をストレスバイオテクノロジーと呼ぶことにすれば,^{1,2)} とくに細胞膜におけるストレスに焦点をおくものはメンブレン・ストレスバイオテクノロジーである。前者の研究は最近のストレス応答の生理学的、分子生物学的研究の進展とあいまって次第に注目されつつあるが、後者の展開はまだそれほど目立っていないようである。著者ら³⁾は食品や環境の殺菌・静菌などの微生物制御を応用的研究分野としつつ、他方ではその基礎として種々の物理的、化学的ストレスによる微生物細胞の損傷と応答機構の解析研究を進めてきている。このテーマでは、以前に殺菌・静菌におけるストレスバイオテクノロジーの概念と題して本誌特集に記述している⁴⁾が、それらの内容には細胞膜に関するものが多くあり、そこで本稿では、その後の研究も含めてそれらの概括的な内容を紹介したい。

殺菌プロセスとそのストレスによる細菌細胞膜の損傷

殺菌プロセスの適用において、食品など殺菌対象物の品質劣化を考慮しなければならない場合には比較的温和な条件が設定される。そのために殺菌処理直後には生死が決定されていないいわゆる損傷菌が多数発生し、その回復の可否によって殺菌効果が左右されることになる。したがって、このような場合、より信頼性の高い適用条件設定や効果の評価・予測を行うためには、細胞の損傷・回復について細胞レベル、さらには分子レベルでの理解が必要となる。殺菌処理は微生物にとっては致死のストレスにさらされることであり、その種類によって細胞のさまざまな部位が損傷を受け、また修復されるが、それらの事象の因果関係はきわめて複雑である。⁴⁾

致死のストレスによる細胞膜の損傷では、細胞膜の構造・機能の損傷に加えてそれが基になって DNA やタンパク質など他の分子に二次的な損傷を誘起することがある。たとえば、好気条件下での細菌を加熱処理したとき、その致死効果は熱の一次的作用だけでなく、熱による細胞膜損傷のためにそこに局在する呼吸系酵素から活性酸素が多く発生し、それによって酸化損傷が発生して死に至る場合がある。⁴⁾ また、加熱処理においては、その間

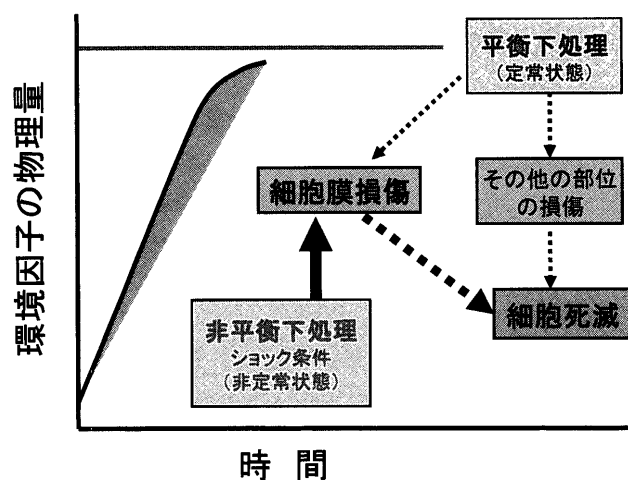


図1. 非平衡下での物理的処理による細菌細胞膜の損傷と死滅⁴⁾

の一定温度での加熱効果だけを問題にするいわゆる平衡条件下での損傷だけでなく、加熱前の温度から致死温度への昇温過程、すなわち非平衡条件下での温度ショックによる損傷も考えるべきである。加熱に限らず、この非平衡下での急激な致死のストレスにおいては、外界との境界に位置する細胞膜に損傷が起こりやすいことが想像できる(図1).⁴⁾

次にストレス後の回復と応答については、これらの過程で細胞のストレス応答システムがその機能に深く関わっている。紫外線による損傷は、放射線生物学の分野で詳細に DNA 修復機構が研究され、SOS 応答の存在も明らかにされたが、加熱処理においては熱ショック応答に関係する特異的なシャペロンタンパク質やプロテアーゼなどの熱ショックタンパク質が機能し、過酸化水素やパラコートなどの活性酸素発生薬剤による処理においても酸化ストレス応答が発現することが知られている。⁵⁾ さらに、各種ストレスによって、大腸菌では σ^S 、枯草菌では σ^B が調節因子である一般ストレス応答も作動する。⁵⁾ 本稿で問題にしている細胞表層の損傷に対しては、大腸菌では σ^E が支配する表層ストレス応答が働くことも報告され⁵⁾、そのシステムが解明されつつある⁶⁾。

著者らは、物理的および化学的ストレスにさらした細菌細胞における損傷とその回復、適応、応答、耐性につ

* 著者紹介 (代表) 関西大学工学部生物工学科 (教授) 〒564-8680 吹田市山手町3-3-35
TEL. 06-6368-1121 FAX. 06-6388-8609 E-mail: tsuchi@ipcku.kansai-u.ac.jp

いて、比較的古くから検討してきている⁷⁾。とくに加熱処理については、大腸菌を対象にその熱死滅に対する細胞膜における脂質相転移、相分離の関与を指摘し、それらが急速加熱や加熱直前の保持温度による熱耐性変動の要因であることを示唆した。⁷⁻¹⁰⁾ また、加熱処理細胞について、外膜構造のブレップ化、膜泡遊離化、ペリプラズム酵素漏出、リポ多糖遊出、細胞表面疎水性の上昇、ホスホリパーゼ感受性化、疎水性蛍光色素透過、疎水性抗菌剤感受性化などの事象を報告し、その外膜損傷機構を明らかにするとともに、⁷⁻¹⁰⁾ 細胞質膜や細胞質のタンパク質・酵素の損傷、失活についても解析してきている。⁷⁻¹⁰⁾ さらに、加熱後の損傷細胞の適温保温中に、リポ多糖の再合成を中心とした外膜透過障壁の修復が起こること、熱ショックタンパク質の選択的な誘導合成が見られ、とくに低分子熱ショックタンパク質ファミリーの IbpA と IbpB に特徴的な挙動が観察されることなどを報告した。⁷⁻¹⁰⁾ これらの分子的な修復に呼応して細胞の顕著な熱抵抗性化現象も認められ、⁷⁻¹⁰⁾ 選択培地上でのコロニー形成能によって評価できるいわゆる損傷菌の回復特性についても知見を蓄積してきている。⁷⁻¹⁰⁾

温度ショックストレスによる枯草菌の細胞膜障害と それに基づく DNA 鎖切断および自己溶菌の 誘発による殺菌

細胞膜の損傷により二次的な損傷が引き起こされ、それが死滅をもたらすと考えられる事象の第 1 の例として、枯草菌の温度ショックによる DNA 鎖切断を取り上げる。

大腸菌やサルモネラにおいて致死的な加熱や低温ショック処理による DNA 損傷と細胞死が報告されている。^{9,10)} 大腸菌の DNA 修復系酵素の欠損株などでは親株と比較して加熱処理後の生存率が低下することから、DNA 損傷が死滅因子の一つではないかと考えられているが、その要因については明らかにされていない。著者らは枯草菌 168 を用い、加熱ショックと低温ショックによる DNA 切断現象とそれに関わる因子の特定、および死滅への関与について検討した。^{11,12)} これらの温度ショックによる DNA 切断条件を調査したところ、半致死的条件である 0℃ への低温ショック処理や、55℃ への熱ショック処理によって、Ca²⁺ または Mn²⁺ を含有する最少培地や L 培地で DNA の切断が確認された。この DNA 切断は、ZnCl₂ の添加では阻害されず、アウリントリカルボン酸では阻害されたことから、細胞に存在する Zn²⁺ 耐性で Ca²⁺ または Mn²⁺ 依存性の DNase の関与が示唆

された。活性染色法で検出された枯草菌の複数の DNase 群の中から、金属イオン依存性、阻害剤感受性および native 状態で活性型か不活性型で存在するののかによって判別したところ、強い活性を示す 39 kDa の DNase が、有力な候補として挙げられた。この DNase 活性は膜タンパク質であることが示唆されたため、膜画分を出発材料として精製し、その性質を調べた結果、広範囲の pH で DNase 活性を有し、至適 pH は 7～8、至適反応温度は 40～45℃ で、55℃ までは失活が認められない耐熱性酵素であった。また、自己の染色体 DNA だけでなく、環状プラスミド、一本鎖 DNA、RNA を基質とすることからヌクレアーゼであることがわかった。DNA エンドヌクレアーゼと相同性を示す未知機能遺伝子破壊株の解析から、*yokF* 遺伝子が活性染色で検出される 39 kDa 型をコードすること、またその分解型である 28 kDa のヌクレアーゼもコードしていることが分かった。*yokF* 遺伝子破壊株では DNase 活性がほとんど検出されず、致死温度ショック処理でも *in vivo* DNA 切断が観察されなかった。*yokF* 遺伝子破壊株は親株と比較して温度ショック後の生存率が若干増加することから、主要な因子ではないながらもこの死滅因子の一部と考えられる。*yokF* 遺伝子破壊株は親株よりも形質転換効率が增加することから、細胞外核酸の代謝に関与していることが示唆された。さらに *yokF* 遺伝子破壊株は、変異誘発作用があるマイトマイシン C に対して感受性を示したことからこのヌクレアーゼが DNA 損傷時の防御因子の一つであることが示唆された。YokF 前駆体は II 型シグナルペプチドを含むリポタンパク質であり、温度ショック時の膜損傷にともなうその局在性が変化し、結果的に染色体 DNA を攻撃して切断するものと推察された。このモデルを図 2 に示す。

細胞膜が介在すると推察される二次的損傷の第 2 の例は、細胞壁ペプチドグリカンの加水分解を起こすオートリシンの活性化による細胞の自己溶菌誘発と死滅である。枯草菌では *culB* (*lytD*) による低温ショックでの自己溶菌が報告されている¹³⁾ が、ペプチドグリカン分解酵素であるオートリシンは、通常の増殖期にはその活性が細胞膜近傍で制御されているが、低温ショックや嫌気処理、低濃度の界面活性剤添加などによって活性化され、自己溶菌を引き起こす。^{14,15)} 著者らは、この現象を殺菌に利用したものを自殺誘発殺菌と呼んでいる。^{14,15)} ただ、この酵素が細胞膜上でどのように活性制御されているのかについてはよくわかっていない。著者らは、一価カチオンによる *Geobacillus stearothermophilus* の自己溶菌誘発

[カラー頁参照]

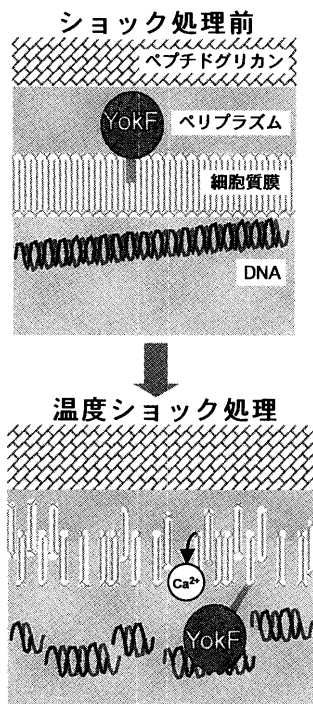


図2. 温度ショック処理した枯草菌細胞における細胞膜損傷とそれに基づく YokF DNase 活性化のモデル¹²⁾

機構を現在検討中で、それに関与するオートリシンの特定を図っている。¹⁶⁾

食塩ショック殺菌と改変 GFP を用いる細胞膜障害のモニタリングの試み

高濃度の食塩には水分活性の低下とともにそれ自体に静菌作用があり、食品の保蔵に利用されるが、上述の温度変化と同様、急激な濃度変化を伴う非平衡条件（浸透圧ショック）下では細胞死滅が起こる。とくに食塩ショックでは顕著な殺菌作用が見られ、大腸菌を数モル程度の濃度の食塩にさらし、その後低張液に戻すと急速な死滅が起こる。¹⁷⁾ この食塩ショックによる殺菌の特性と作用機構を調べた。¹⁷⁾

この食塩ショック死はショック後数分間急激に起こり、その後緩やかな速度で進行する2相性が観察された。高張液の条件が高濃度側、アルカリ側、ショック時の希釈倍率が高いほど死滅の度合いが上昇した。また、死滅の程度は4、20°Cの低温域より37、45°Cで上昇した。この場合もショックによる細胞膜の損傷が考えられ、とくにその透過制御能の変化を分子レベルで検討することを企図した。大腸菌など細胞内の無機塩濃度と pH は、細胞膜にある NhaA や NhaB などの Na⁺/H⁺ アンチポー

[カラー頁参照]

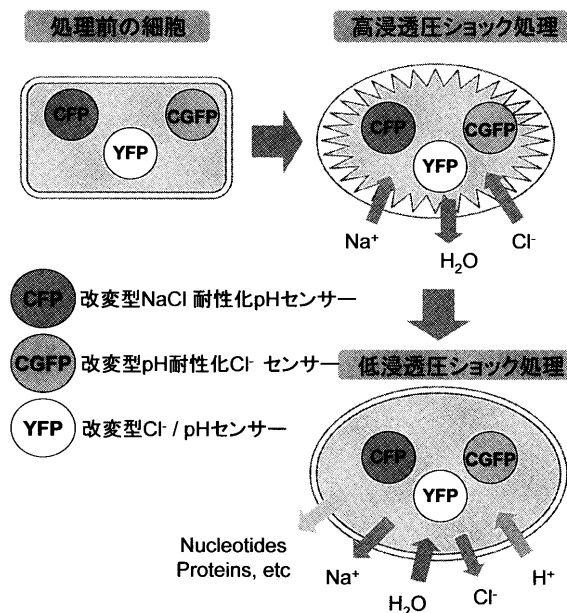


図3. 細菌細胞における細胞膜の透過性制御機能の損傷モニタリングツールとしての改変型 GFP の利用²²⁾

ターの働きにより厳密に制御され、細胞外環境によって大きく変動することなく、恒常性が維持されている。¹⁸⁾ しかし、細胞がその限界を超える程度の浸透圧ショックなど物理的ストレス処理にさらされたとき、細胞膜の損傷が引き起こされ、これらの恒常性が崩壊し、Na⁺やCl⁻が多く細胞内に流入すると推察される。そこで、この可能性を検討するための新しいセンサー細胞の構築を試みた(図3)。

近年、GFP (緑色蛍光タンパク質) を基にした pH, Ca²⁺, Zn²⁺, cAMP など種々の指示薬が報告されている。¹⁹⁾ そのなかの Cl⁻ センサーとして報告された²⁰⁾ 黄色蛍光タンパク質 (YFP-H148Q) にフォールディング能向上に関わる変異を導入して蛍光特性を強化した Cl⁻ センサーの変異体を構築した。この YFP 変異体は蛍光強度が高く、高感度であったが Cl⁻ だけでなく酸性 pH に対しても感受性を示す欠点が存在した。そこで新たに pH と Cl⁻ の変化を独立して検出するためのセンサーを構築した GFP 変異体からスクリーニングした。その結果、3M 食塩存在下でも消光しないが、酸性 pH に対しては感受性を示す CFP 変異体と、Suwano ら²¹⁾ により報告された酸性 pH 耐性の CGFP 型の変異体から pH 耐性であるが Cl⁻ に対して感受性を示すものを見だし、新規 Cl⁻ センサーとした (未発表)。

これら改変 GFP センサー発現細胞を用いて、食塩

ショックにおける細胞内の pH および Cl^- 濃度の変動を調査した. pH7.0 に調製した各濃度の食塩を含む 50 mM HEPES 緩衝液中でショック処理を行ったところ, 食塩による高浸透圧ショックでは細胞内の CFP の消光は観察されず, 細胞内成分の漏洩および pH 変動はほとんど観察されなかったが, YFP や CGFP は 2 M 付近の濃度での食塩ショックで急激な消光が認められた. ショ糖などを用いた高浸透圧ショックでも若干の消光を示したが, 食塩ショックよりも微弱であることから, 高浸透圧時の脱水による細胞内塩濃度の増加と考えられた. この 800 mM までの食塩濃度では蛍光レベルの変動は非常に小さかったが 1~2 M 以上で急激に消光することから, この濃度付近が細胞膜のイオン透過障壁としての限界域ではないかと推測された. また食塩の高塩濃度から 200 mM 以下への低浸透圧ショックにさらすことにより, 細胞内で発現させた GFPuv の漏洩が観察され, 細胞膜の物理的破断に関与することが示唆された. これらの改変 GFP は, 細胞膜の透過性制御機能における障害をモニタリングすることに利用できるものと期待される (未発表).

なお, 著者らは大腸菌の食塩ショック死はカタラーゼ添加によって低減され, またカタラーゼ二重欠損株 (*katE katG*) では感受性化することを見いだしている. また植物の食塩ストレス処理では金属ナトリウムの流入により活性酸素が発生するとの報告²²⁾があることから, 他のいくつかのストレスと同様に, 食塩ショック処理によって細胞内に二次的に過酸化水素が発生している可能性が考えられる.

微生物制御技術である殺菌をストレスバイオテクノロジーの 1 分野として位置づけるならば, 本稿で述べた細胞膜の損傷誘発による細胞制御は 1 つのメンブレン・ストレスバイオテクノロジーと考えることができる. その生死が殺菌処理直後にはまだ定まっていない損傷細胞において, 細胞膜を介して細胞内の状況を迅速にモニタリ

ングすることはその後の挙動を予測する上で有益な知見を与えるだろう. したがって, モニタリングの一例としてここで紹介した改変 GFP のようなツールも, 有用なメンブレン・ストレスバイオテクノロジーの 1 つと言える. 微生物学分野でのこのような細胞膜に対するストレスを活用する技術は, 細胞表層構造変化や薬剤排出機能に関わる細菌の薬剤耐性化の評価や自然環境に生息する微生物の検出, 生理・生態学的挙動の解析などへも適用することができるだろう.

文 献

- 1) 土戸哲明, 松村吉信: 生物工学, **77**, 225 (1999).
- 2) 土戸哲明: ケミカルエンジニアリング, **47**, 737 (2002).
- 3) 土戸哲明ら: 微生物制御—科学と工学, 講談社サイエンスフィク (2002).
- 4) 土戸哲明: 食品微生物学会雑誌, **20**, 141 (2004).
- 5) Ravio, T. L. and Silhavy, T. J.: *Bacterial Stress Responses* (Storz, G. and Hengge-Aronis, R.), p. 19, ASM Press, Washington, D. C. (2000).
- 6) Young, J. C. and Hartl, F. U.: *Cell*, **113**, 1 (2003).
- 7) 土戸哲明: 防菌防黴, **32**, 251 (2004).
- 8) 土戸哲明: 凍結及び乾燥研究会誌, **39**, 61 (1993).
- 9) 土戸哲明: 食品科学工学会誌, **46**, 1 (1999).
- 10) 土戸哲明: 防菌防黴, **18**, 75 (1990).
- 11) Sakamoto, J. J. et al.: *Biocontrol Sci.*, **7**, 63 (2002).
- 12) Sakamoto, J. J. et al.: *J. Biol. Chem.*, **276**, 47046 (2001).
- 13) Yamanaka, K. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **150**, 269 (1997).
- 14) 土戸哲明: 新世紀の食品加工技術 (藤田 哲, 小林登史夫, 亀和田光男編), p.152, シーエムシー出版 (2002).
- 15) Tsuchido, T. et al.: *Biocontrol Sci.*, **2**, 19 (1996).
- 16) 修理亜也子ら: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 88 (2003).
- 17) 林 絹美ら: 食工大会講演要旨集, p. 72 (2003).
- 18) Padan, E. and Schuldiner, S.: *J. Exp. Biol.*, **196**, 443 (1994).
- 19) Zhang, J. et al.: *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 906 (2002).
- 20) Jayaraman, S. et al.: *J. Biol. Chem.*, **275**, 6047 (2000).
- 21) Sawano, A. and Miyawaki, A.: *Nucleic Acids Res.*, **28**, E78 (2000).
- 22) Hong, Z. et al.: *Plant Physiol.*, **122**, 1129 (2000).